

09/857213
PCT/JP99/07106

17.12.99

日本国特許庁

JP99/7106
EU
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 04 FEB 2000
WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年12月22日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第364295号

出願人
Applicant(s):

第一化学薬品株式会社

#4
B.12
2/15/02

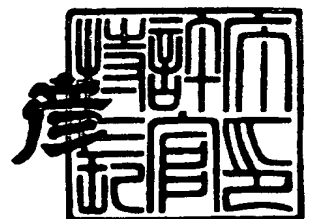
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 1月21日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3095524

【書類名】 特許願

【整理番号】 P05651012

【提出日】 平成10年12月22日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明の名称】 アポリポ蛋白質 A - I に対するモノクローナル抗体

【請求項の数】 5

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県那珂郡東海村村松 2 1 1 7 第一化学薬品株式会社
社診断薬研究所内

【氏名】 宮崎 修

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県那珂郡東海村村松 2 1 1 7 第一化学薬品株式会社
社診断薬研究所内

【氏名】 深町 勇

【特許出願人】

【識別番号】 390037327

【氏名又は名称】 第一化学薬品株式会社

【代理人】

【識別番号】 100068700

【弁理士】

【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100077562

【弁理士】

【氏名又は名称】 高野 登志雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100096736

【弁理士】

【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100101317

【弁理士】

【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【選任した代理人】

【識別番号】 100106909

【弁理士】

【氏名又は名称】 棚井 澄雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011752

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アポリポ蛋白質 A-I に対するモノクローナル抗体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (1) 分子量が 15 万以下で、かつヒトアポリポ蛋白質 A-II を持たない HDL に存在するヒトアポリポ蛋白質 A-I 及び (2) 脂質と結合していないヒトアポリポ蛋白質 A-I と特異的に反応するモノクローナル抗体。

【請求項 2】 請求項 1 記載のヒトアポリポ蛋白質 A-I (1) 及び／又は (2) を含有する血漿又は血清を 37℃ に加温したときに、該 (1) 及び／又は (2) との反応が著しく低下する請求項 1 記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 4】 請求項 1 又は 2 記載のモノクローナル抗体を検体に反応させることを特徴とするヒトアポリポ蛋白質 A-I の免疫学的測定法。

【請求項 5】 請求項 1 又は 2 記載のモノクローナル抗体を含有するヒトアポリポ蛋白質 A-I の測定試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、特定のヒトアポリポ蛋白質 A-I (以下、「アポ A-I」という) に対するモノクローナル抗体、これを用いた特定のアポ A-I の免疫学的測定方法及びこれを含む免疫学的測定試薬に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

アポ A-I は HDL を構成する主なアポタンパク質であり、HDL の末梢細胞から肝臓へのコレステロールを逆転送する機能において中心的な役割を果たしているものである。(Philips M. C. et al. Biochem. Biophys. Acta, 906:p.223-, (1987))。このことから、動脈硬化症の診断にアポ A-I を測定することが行われている。

【0003】

近年、アポリポ蛋白質A-II（以下、「アポA-II」という）を持たないアポA-I含有HDL（石塚ら：医学と薬学、39巻5号、1041頁、1988）が、アポA-I及びアポA-II含有HDLより細胞からのコレステロール引き抜き作用が強いことや、脂質とは結合せずに存在するアポA-Iや小粒子で脂質含量の少ないpre β 1-HDL（T. Miida, et al. Biochemistry, 29:p.10469-, (1990)）に存在するアポA-Iが細胞からのコレステロールの逆転送系において重要な役割を演じていることが判明したことから、これら特定のアポA-Iを測定することが重要となってきた。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、特定のアポA-Iと選択的に反応する抗体がなかったため目的とするアポA-Iを電気泳動法、免疫沈殿法等で他のアポA-Iと分離する必要があり、簡便に測定するのは不可能であった。

【0005】

【課題を解決するための手段】

このような実情において、本発明者は鋭意研究を行った結果、特定のアポA-Iに対し特異的に反応するモノクローナル抗体を得ることに成功し、これを用いれば脂質代謝異常をより正確に測定できることを見出し、本発明を完成した。

【0006】

すなわち、本発明は、（1）分子量が15万以下で、かつアポA-IIを持たないHDLに存在するアポA-I及び（2）脂質と結合していないアポA-Iと特異的に反応するモノクローナル抗体、この抗体を産生するハイブリドーマ、この抗体を検体に反応させることを特徴とするアポA-Iの免疫学的測定法並びにこの抗体を含有するアポA-Iの測定試薬を提供するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】

本発明のモノクローナル抗体は、例えば次の方法で製造することができる。

【0008】

免疫原としてはアポA-Iを含むリポタンパク質もしくは精製したアポA-I

を用いる。免疫に使用する動物としては特に限定されないが、一般的にはマウス、ラットなどが使用される。免疫方法は、一般的な手法に従って行うことができる。例えば、免疫原を通常の緩衝液や生理食塩水に懸濁させたもの、あるいは、フロイド・コンプリート・アジュバンドなどの補液との混合物を、動物の皮下、皮内、腹腔などに投与して一時刺激後、必要に応じて同様の操作を繰り返す方法が挙げられる。抗原の投与量は投与経路、動物種に応じて適宜決定されるが、通常の投与量は、1回当たり $10\mu\text{g}$ ～ 1mg 程度とするのが適当である。細胞融合に用いる免疫細胞は、最終免疫の3～4日後に摘出した脾臓細胞が好適である。また、前記免疫細胞と融合させる他方の親細胞としての骨髓腫細胞（ミエローマ細胞）としては既に確立されている公知の各種細胞株、例えば、マウスにおけるNS1（P3/NSI/I-Ag4444-1）[Eur. J. Immunol. 6:511-519(1976)]、SP2/O-Ag14 [Nature 276:269(1978)]、P3X63-Ag8.653 [J. Immunol. 123:1548(1979)]、P3X63-Ag8U.1 [Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81:1(1978)]等や、ラットにおけるY3-Ag1.2.3 [Nature 277:131-133(1979)]、YB2/O (YB2/3HL/P2.G11.16Ag.20) [Methods Enzymol. 73B:1(1981)]等が挙げられ、これらは何れも使用することができる。細胞融合には通常用いられるポリエチレングリコール（PEG）、センダイウイルス（HVJ）、等を使用することができる。細胞融合は通常の方法と同様にすればよく、例えば免疫細胞は骨髓細胞に対して約1～10倍で、ポリエチレングリコールは平均分子量1000～6000のものを30～60%の濃度で使用し、免疫細胞と骨髓細胞の混合ペレットに滴下し混ぜ合わせる方法が挙げられる。ハイブリドーマの選択は、通常の選択培地、例えばHAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培地）を用いて行えばよい。

【0009】

HAT培地で培養後、得られたハイブリドーマは、通常の限界希釈法に従い、目的とする抗体の産生株の検索及び単一クローン化が行われる。目的とする抗体の産生株の検索には、例えば、ELISA法、RIA法等が利用でき、これによりある特定のA α -Iに対してのみに特異的に反応する抗体を産生するハイブ

リドーマを選択することができる。

【0010】

本発明のモノクローナル抗体を選択するには、次のような方法が挙げられる。

まず、培養上清中のモノクローナル抗体を抗マウス IgG 抗体等を介して固相化し、これに血漿などのリポタンパク質混合液を反応させる。次に、酵素などで標識した抗アポ A-I 抗体もしくは同じく標識したアポ A-II に対する抗体を反応させ、抗アポ A-I 抗体の系のみに反応し、且つ抗アポ A-II 抗体の系とは反応しないモノクローナル抗体を選択する。

このようなモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとしては、本発明者が見出したハイブリドーマ 55201 が挙げられ、このハイブリドーマ 55201 は、工業技術院生命工学工業技術研究所に FERM P-17055 として寄託した。

【0011】

かくして得られる抗体産生ハイブリドーマからの抗体の製造は、常法に従いハイブリドーマを培養し、培養上清から分離する方法、あるいは、前記ハイブリドーマをこれと適合性のある哺乳類動物に投与し、腹水として回収する方法により実施できる。

【0012】

本発明のハイブリドーマ 55201 が産生するモノクローナル抗体 55201 は次の性質を有する。

- A. (1) 分子量が 15 万以下で、かつアポ A-II を持たない HDL に存在するアポ A-I 及び (2) 脂質と結合していないアポ A-I に反応する。
- B. ヒト健常者血漿を超速心分離装置で VLDL、LDL、HDL 2、HDL 3 及びボトム (Bottom) の 5 つの画分に分離したとき、HDL 3 及びボトム画分中のアポ A-I に反応する。

【0013】

- C. A のアポ A-I (1) 及び／又は (2) を含有する血漿又は血清を 37℃ に加温したときに、該 (1) 及び／又は (2) との反応が著しく低下する。

【0014】

本発明の前記抗体を用いて、従来の任意の免疫学的測定方法により、ヒト体液中の特定のアポA-Iを測定することができる。例えば、ELISA法で測定する場合には、精製したアポA-Iを標準品として次のような方法で定量することができる。即ち、固相化した本発明のモノクローナル抗体を固相化したELISAプレートに、希釈した試料を添加し反応させた後、酵素標識した抗アポA-Iポリクローナル抗体を反応させ、発色後吸光度の変化から試料中に存在するアポA-Iを定量する方法が挙げられる。

【0015】

【発明の効果】

本発明の特定のアポA-Iに特異的に反応する抗体を使用することにより、ヒト体液中の特定のアポA-Iを測定することが可能となり、脂質代謝異常等の新たな指標がもたらされる。

【0016】

【実施例】

次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明は、これらに限定されるものではない。

【0017】

実施例1（モノクローナル抗体の調製）

（1）ハイブリドーマの調製

ヒト健常者プール血清から超遠心分離法によりHDLを分離し、これをエタノールとエーテルの混合液及びエーテルにて脱脂した。つづいて窒素ガスにてエーテルを完全に除去後、8M尿素溶液にて再溶解し、セファクリル S200カラム（Pharmacia社製）を用いゲル濾過を行った。分離した各フラクションからアポA-Iを含むフラクションをプールし、PBSで透析後免疫原とした。この免疫原と完全フロイントアジュバンド（GIBCO社製）とを1対1で混和乳化し、0.1mg/0.1ml（エマルジョン）で6週齢の雌BALB/Cマウスの皮下に1週間間隔で6回投与後、最終免疫の2日後に脾臓を摘出した。摘出した脾臓から得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞SP2/O-Ag14とを6対1の割合で混合し、50%ポリエチレングリコール1540（和光純薬社製）存在下にて細胞融合

させた。融合細胞は脾臓細胞として 2.5×10^6 /mlになるようにHAT培地に懸濁し、96穴培養プレート（CORNING社製）に0.2mlずつ分注した。これを5%CO₂インキュベーター中で37℃にて培養し、おおよそ2週間後に、ハイブリドーマの生育してきたウェルの培養上清について、次に示すELISA法にしたがって有望抗体産生株を選択した。即ち、まず、マイクロプレート（NUNC社製）にヤギ抗マウスIgG（Fc）抗体（JACKSON社製）を介し、各培養上清中のIgGを固相化した。これにヒト健常者血漿希釈液を添加し、アポA-Iを含むリポタンパク質（主にHDL）を反応させた。つづいて、アポA-Iを山羊に免疫して得たヤギ抗アポA-I抗体をビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミド（ZYMED社製）を用いビオチン化したビオチン標識抗アポA-I抗体、もしくはアポA-IIを山羊に免疫して得たヤギ抗アポA-II抗体を同様にビオチン化したビオチン標識抗アポA-IIを反応させ、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（ZYMED社製）を反応後、オルトフェニレンジアミン（東京化成社製）を含む基質溶液で発色させた。これをマイクロプレートリーダー（A.492）で測定し、ビオチン標識抗アポA-I抗体を用いた系で高い反応性を示し、且つビオチン標識抗アポA-II抗体を用いた系では反応性を示さなかった株を選択した。このハイブリドーマを限界希釈法によりクローン化を行い、モノクローナル抗体ハイブリドーマ55201を作製した。

【0018】

（2）モノクローナル抗体の調製

あらかじめ2週間前にプリスタン0.5mlを腹腔内に注射しておいた12週齢の雌BALB/Cマウスに、ハイブリドーマ55201を細胞数 0.5×10^6 個の量で腹腔内に投与した。約14日後に腹水を採取し、遠心処理して上清を得た。上清を等量の吸着用緩衝液（3M NaCl-1.5M グリシン-NaOH, pH8.5）と混和後、濾過した。この濾液を吸着用緩衝液で平衡化したプロテインAカラム（ファルマシア）に通して抗体をカラムに吸着させた後、0.1Mクエン酸緩衝液（pH3.0）で溶出させてモノクローナル抗体55201を精製した。

【0019】

実施例 2 (モノクローナル抗体の特異性)

(1) ELISA法

実施例 1 で得たモノクローナル抗体 (55201) を 20 mM リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.2) で $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調整後、96 穴 ELISA プレート (ヌンク社製) に $50 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ 加え、 4°C で一夜インキュベートした。プレートを PBS で 3 回洗浄後、ブロッキング液 (1% BSA を含む PBS) を $100 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ 加え、1 時間ブロッキングした。ブロッキング液を除去後、ブロッキング液にて希釈したヒト健常者血漿希釈液を $50 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ 加え、室温で 1 時間インキュベートした。ブロッキング液で 3 回洗浄した後、ビオチン標識ヤギ抗アポ A-I 抗体、もしくはビオチン標識抗アポ A-II 抗体を $50 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ 加え、室温で 1 時間インキュベートした。同様にブロッキング液で 3 回洗浄した後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを加え、室温で 30 分間インキュベートした。再びブロッキング液で 3 回洗浄した後、ペルオキシダーゼ基質溶液を $50 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ 加えた。10 分後、1.5 N 硫酸を $50 \mu\text{l}/\text{ウェル}$ 加え、492 nm における吸光度を測定した。

この結果を図 1 に示す。図 1 より、モノクローナル抗体 55201 はアポ A-II を含む HDL とは反応せず、アポ A-I のみを含む HDL と特異的に反応することが示された。

【0020】

(2) ウェスタンブロット法

実施例 1 で得た抗体が、アポ A-I に対する抗体であることを確認するため、ウェスタンブロット法により解析した。即ち、ヒト健常者血清を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、PVDF 膜 (ミリポア社製) に電氣的に転写し、3%-スキムミルクを含む PBST (0.05% Tween 20 を含む PBS) で 1 時間ブロッキング後、一次抗体としてモノクローナル抗体 55201 を、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 (AMERICAN QUALEX 社製) を反応させた。PVDF 膜を PBST で洗浄後、ジアミノベンジジンを基質として加え、発色させた。図 2 に示す如く、モノクローナル抗体 55201 は分子量 28000 のアポ A-I に対するバンドのみ認められ、アポ A-I に対す

る特異抗体であることが確認された。

【0021】

(3) ゲル濾過分離画分に対する反応性

実施例 1 で得た抗体の特異性を検討するため、ヒト健常者血漿をゲル濾過にて分離し、その分離した各画分に対する反応性を調べた。即ち、ヒト健常者血漿をゲル濾過用カラム 4 本 (TSK-GEL G3000SW、7.5mmID×60cm 2 本、同 G3000SW、7.5mmID×30cm 1 本、ファルマシア スーパーデックス 200HR10/30) を接続させたファルマシア FPLC システムにて分離し、各フラクションのアポタンパク濃度を測定するとともに、以下に示す ELISA 法にて各モノクローナル抗体の反応性を比較した。実施例 1 で得たモノクローナル抗体 55201 を 20mM リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.2) で $3\mu\text{g/ml}$ の濃度に調整後、96 穴 ELISA プレート (マシコ社製) に $50\mu\text{l}$ / ウェル加え、4℃ で一夜インキュベートした。プレートを PBS で 3 回洗浄後、ブロッキング液 (1% BSA-PBS) を $100\mu\text{l}$ / ウェル加え、1 時間ブロッキングした。ブロッキング液を除去後、ブロッキング液にて希釈した各フラクション又は精製アポ A-I を $50\mu\text{l}$ / ウェル加え、室温で 1 時間インキュベートした。ブロッキング液で 3 回洗浄した後、アポ A-I を山羊に免疫して得たヤギ抗アポ A-I 抗体を過ヨウ素酸法にてペルオキシダーゼ標識したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗アポ A-I 抗体を $50\mu\text{l}$ / ウェル加え、室温で 1 時間インキュベートした。同様にブロッキング液で 3 回洗浄した後、ペルオキシダーゼ基質溶液を $50\mu\text{l}$ / ウェル加えた。10 分後、1.5N 硫酸を $50\mu\text{l}$ / ウェル加え、492nm における吸光度を測定し、精製アポ A-I を標準品として、各フラクションのアポ A-I 量を算出した。この結果を図 3 (下) に示す。尚、アポ A-I、A-II、E の各アポタンパク質は、各精製アポタンパクを山羊に免疫して得たポリクローナル抗体及びこれを過ヨウ素酸法によりペルオキシダーゼ標識した標識抗体を用いた ELISA 法で測定した。この結果を図 3 (上) に示す。図 3 (下) より、モノクローナル抗体 55201 は主に血漿中に存在する分子量 15 万以下の HDL に存在するアポ A-I、もしくは脂質と結合せずに存在するアポ A-I に対して反応することが示された。

【0022】

(4) 超遠心分離画分に対する反応性

実施例1で得たモノクローナル抗体55201の特異性を検討するため、ヒト健常者血漿30mlを超遠心分離装置(日立)でVLDL、LDL、HDL2、HDL3、及びボトムの5つの画分に分離し、55201抗体と反応する粒子がどの画分に存在するか調べた。即ち、実施例2(3)と同様のELISA法で精製アポA-Iを標準品として分離した画分中のアポA-I量を測定した。この結果を表1に示す。表1より、モノクローナル抗体55201と反応する血漿中の成分はVLDL、LDL及びHDL2の中にはほとんど存在せず、HDL3とボトム中に存在することが判明した。このことから、55201抗体がHDL2のような比重の低い画分に存在するアポA-Iとは反応せず、比重の高いHDL3及びボトムに存在するアポA-Iと反応することが示された。

【0023】

【表1】

分離画分	比重	apoA-I (μ g) *
VLDL	<1.006	0
LDL	1.006~1.063	12
HDL2	1.063~1.125	24
HDL3	1.125~1.21	1296
Bottom	1.21<	1785

*: 55201抗体と反応する粒子中のapoA-I量

【0024】

(5) 37℃加温による影響

実施例1で得たモノクローナル抗体55201の特異性を検討するため、ヒト健常者血漿0.2mlをマイクロチューブに分注後、37℃で2時間インキュベートし、抗体との反応性に与える影響を調べた。即ち、実施例2(3)と同様のELISA法で精製アポA-Iを標準品としてインキュベート前とインキュベート後の血漿中のアポA-I量を測定した。この結果を表2に示す。表2より、イン

キュベート後、反応性が著しく減少することが判明した。

【0025】

【表2】

	測定値 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	インキュベート前	インキュベート後
検体1	19.9	2.1
検体2	20.1	2.7
検体3	16.9	4.0
検体4	20.7	5.0
検体5	21.8	2.2

【0026】

実施例3（測定方法）

実施例1で得た抗体を用い、ヒト血漿中のアポA-Iを測定した。即ち、精製アポA-Iを標準品としてヒト健常者血漿3検体を実施例2（3）と同様のELISA法で測定した結果、図4に示す如く、3検体とも良好な希釈直線性を示し、アポA-Iを測定できることが示された。

【0027】

実施例4（臨床検体の測定）

実施例3で確認された特定のアポA-Iの測定系の臨床的意義について検討するため、高脂血症患者の血漿39検体及び健常者の血漿11検体を実施例2（3）と同様のELISA法で測定した。また、対照として従来技術である血漿中のアポA-I全体の測定を免疫比濁法により自動分析装置で行った。その結果、図5に示す如く、まず、アポA-I全体の測定では患者と健常者で明確な差は認められなかったのに対し、特定のアポA-Iの系では患者と健常者で著しい差が認められ、脂質代謝異常を示す指標として有用であることが示唆された。

【図面の簡単な説明】

【図1】

ELISA法による本発明抗体の特異性を示す図である。

【図 2】

ウェスタンブロット法（電気泳動）による本発明抗体の特異性を示す図である。

【図 3】

ゲル濾過分離した分画に対する本発明抗体の反応性を示す図である。

【図 4】

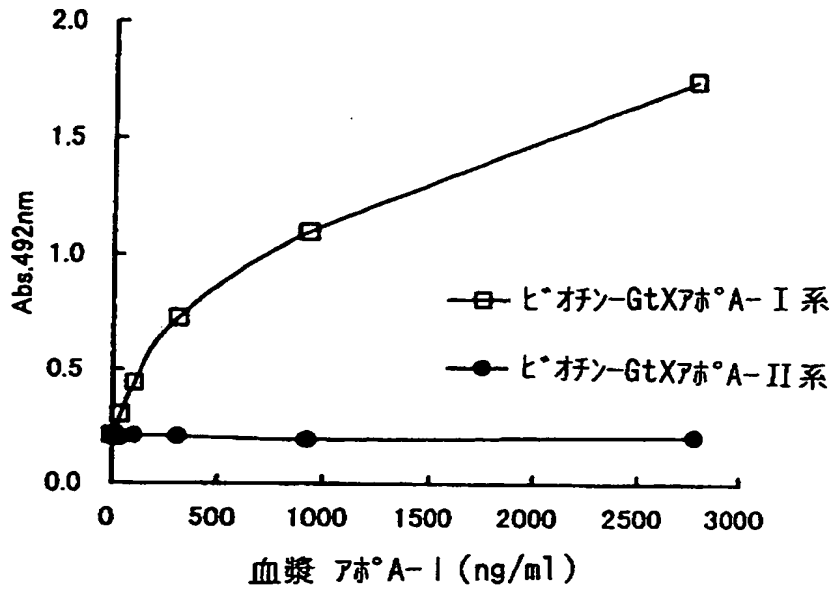
本発明抗体を用いた E L I S A 法での希釈直線性を示す図である。

【図 5】

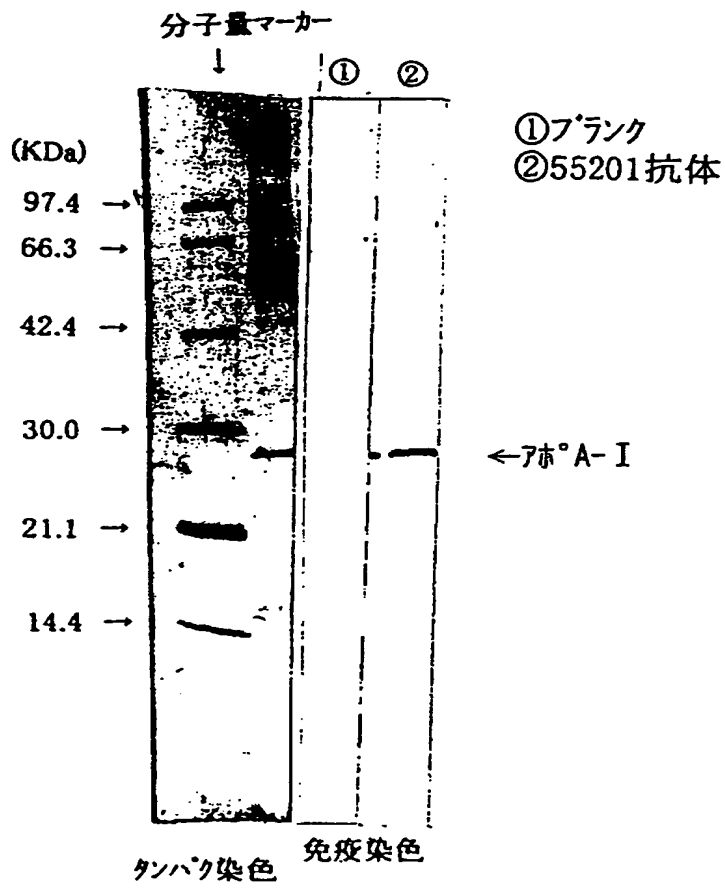
本発明抗体を用いた E L I S A 法で臨床検体を測定した結果を示す図である。

【書類名】 図面

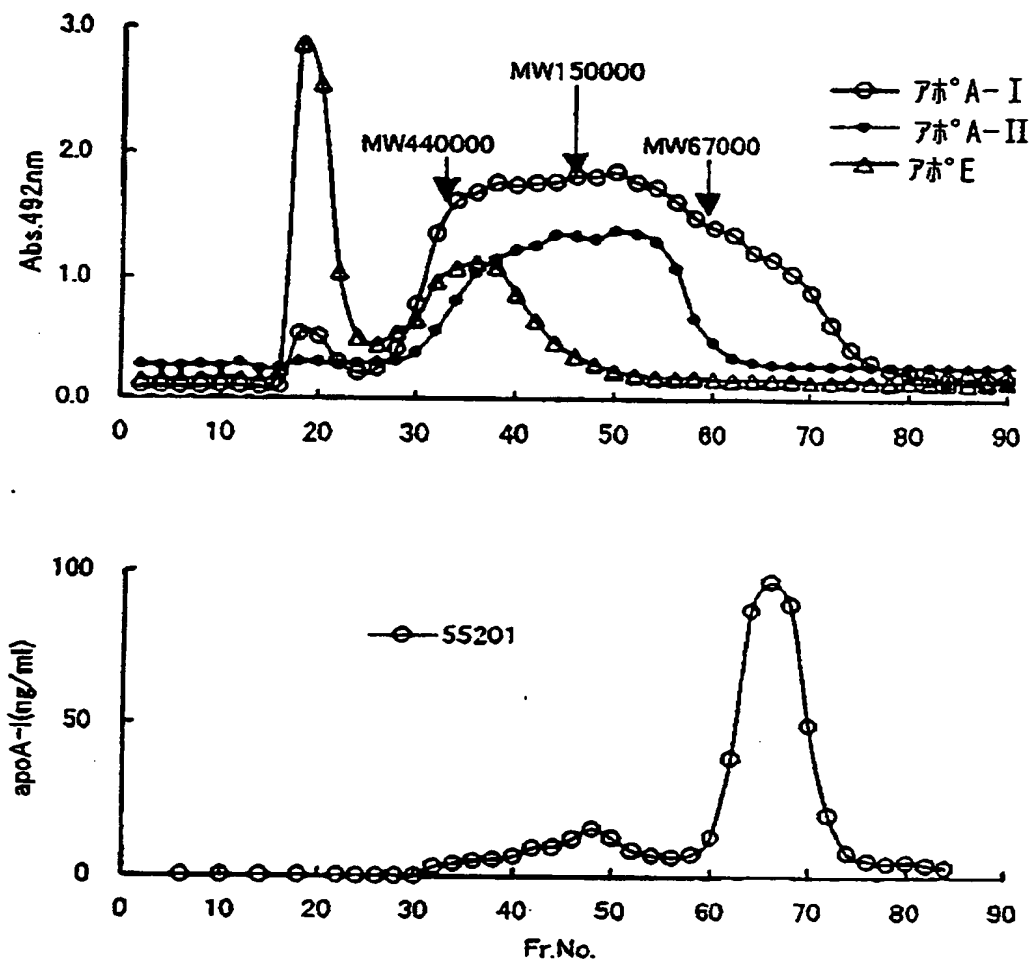
【図 1】



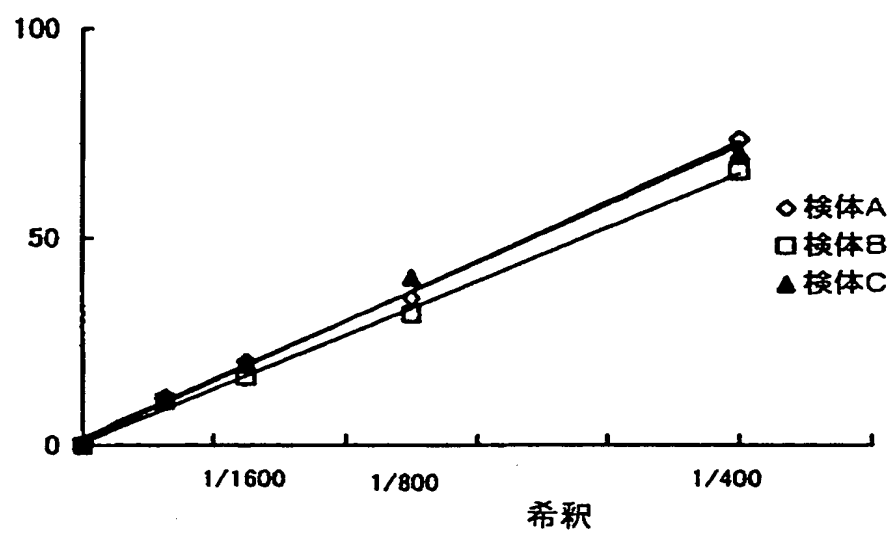
【図2】



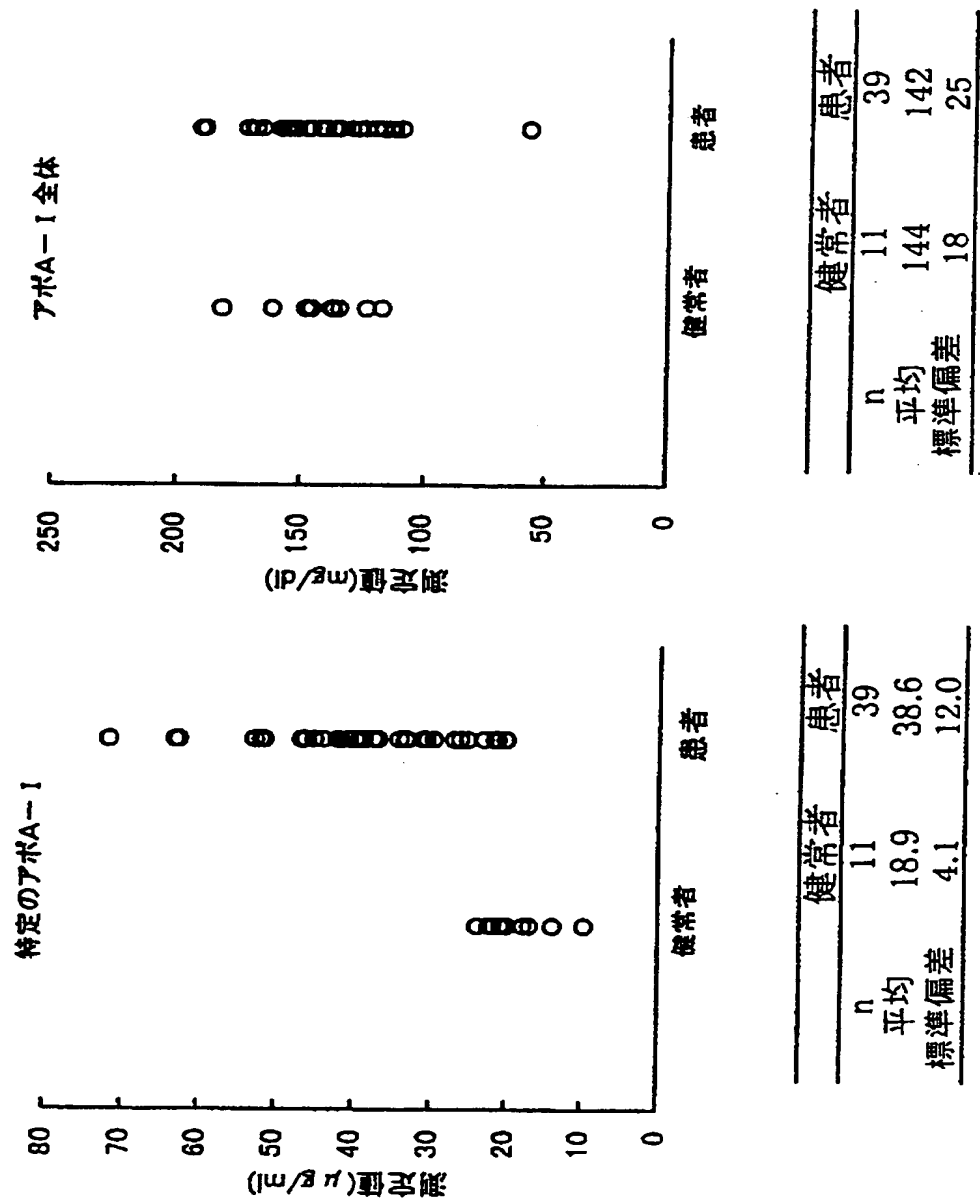
【図 3】



【図4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 (1) 分子量が15万以下で、かつアポA-IIを持たないHDLに存在するアポA-I及び(2) 脂質と結合していないアポA-Iと特異的に反応するモノクローナル抗体、この抗体を産生するハイブリドーマ、この抗体を検体に反応させることを特徴とするアポA-Iの免疫学的測定法並びにこの抗体を含有するアポA-Iの測定試薬。

【効果】 特定のアポA-Iの測定が可能となり、脂質代謝異常等の新たな指標となる。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390037327]

1. 変更年月日	1990年12月12日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都中央区日本橋3丁目13番5号
氏 名	第一化学薬品株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)